

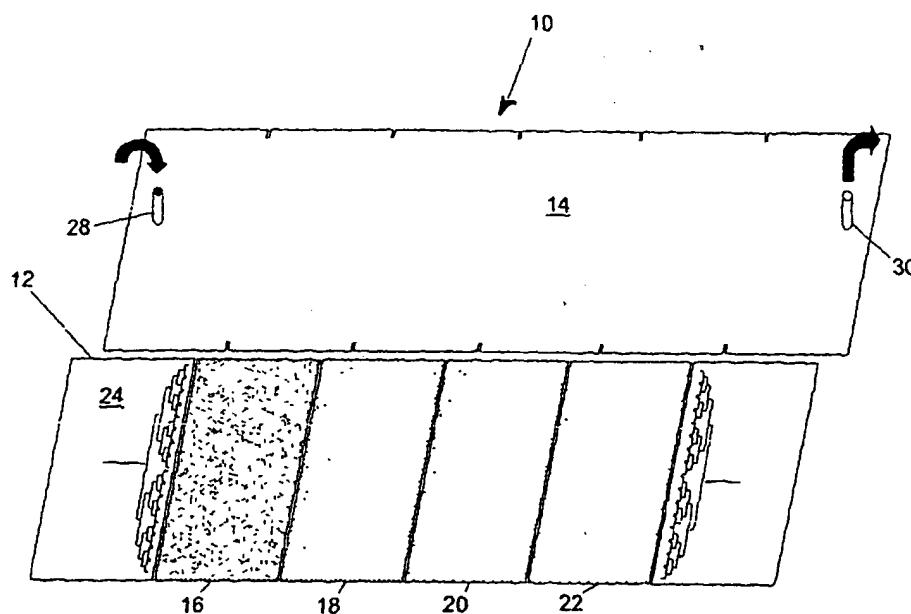
(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Juli 2003 (10.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/056330 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/50** (71) Anmelder und
(72) Erfinder: LASSNER, Dirk [DE/DE]; Brockhausstr. 27,
04229 Leipzig (DE). UHLIG, Holm [DE/DE]; Schkeu-
ditzer Str. 1, 04509 Delitzsch (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14764
- (22) Internationales Anmeldedatum:
27. Dezember 2002 (27.12.2002) (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖHLER, Johann,
Michael [DE/DE]; Untergasse 8, 07751 Golmsdorf (DE).
MAYER, Günter [DE/DE]; Fritz-Reuter Str. 16, 07745
Jena (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 64 578.3 31. Dezember 2001 (31.12.2001) DE (74) Anwalt: BOCK, Gerhard; Patentanwaltsbüro Pfeiffer &
Partner, Winzerlaer Str. 10, 07745 Jena (DE).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Aus- (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, JP, US.
nahme von US): INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE
HOCHTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Winzerlaer Str.
10, 07745 Jena (DE). (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, SI, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CELL SORTING SYSTEM FOR THE SIZE-BASED SORTING OR SEPARATION OF CELLS SUSPENDED IN A
FLOWING FLUID(54) Bezeichnung: ZELLSORTIERSYSTEM ZUR GRÖSSENABHÄNGIGEN SORTIERUNG ODER SEPARATION VON IN
EINER STRÖMENDEN FLÜSSIGKEIT SUSPENDIERTEN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a cell sorting system for sorting or separating cells suspended in a flowing fluid according to the size thereof. Said cell sorting system comprises at least one chip (10, 40, 42) provided with a base plate (12) which is overflowed by the fluid and encompasses a plurality of indentations (31, 60, 62, 70, 80).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/056330 A2

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen. Die Zellsortiersystem zeichnet sich dadurch aus, dass es zumindest einen Chip (10, 40, 42), der eine von der Flüssigkeit überströmte Grundplatte (12) mit einer Vielzahl von Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) beinhaltet, umfasst.

Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen. Die Erfindung findet Anwendung in der medizinischen Diagnostik, Immunologie und Biotechnologie.

10

Es sind einige Techniken bekannt, mit denen nicht in Geweben organisierte Einzelzellen oder aus Geweben isolierte Einzelzellen nach ihrer Größe getrennt und analysiert werden können. Nachstehend beschrieben sind Techniken, die entwickelt wurden, um Zellen nach ihrer funktionellen Aktivität und der Produktion von Sekretionsprodukten zu typisieren und/oder zu sortieren. Weiterhin sind Methoden angeführt, biologische Moleküle und Zellen in hoher Dichte in einem geeigneten Muster auf Festphasen anzuordnen, was eine Grundlage der nachfolgend aufgezeigten Lösung darstellt.

20

1. Die Analyse mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) erlaubt die Detektion und Sortierung von Zellen im wesentlichen nach Oberflächenmarkern. Durch die Auswertung der Streulichteigenschaften (Seiten- und Vorwärtstreulicht) lassen sich bestimmte Population nach der Größe und Oberflächenbeschaffenheit einteilen. Für medizinische Fragestellungen werden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern versetzt und die fluoreszenten Zellen von den nicht gefärbten unterschieden. Somit lässt sich auch eine Sortierung von markerpositiven bzw. -negativen Zellen ermöglichen.

30

Die großen Zellsorter können bis zu $1 \cdot 10^6$ Zellen/min sortieren, aber nur in zwei Gruppen(Gefäße). Für eine nachfolgende Untersuchung müssen die Zellen erst aus der Sortierflüssigkeit pelletiert werden.

35

Durch Beimischung von Latexpartikeln definierter Größe zur Probe lassen sich grobeGrösseneinteilungen der untersuchten Zellen erreichen. Die

- 2 -

Analyse einer großen Zellzahl ist mit dieser Technik in geringer Zeit möglich. (Shapiro 1995).

5 Durch Einsatz der Mikrosystemtechnik konnten Zellsortier-Geräte auf strukturierten Siliziumchip gebaut werden. Dafür wurden Mikropumpen und -ventile in mikrofluidische Kanalsysteme integriert. Diese Mikro-Zellsorter sind teilweise billiger und benötigen ein viel geringeres Volumen an Trägerflüssigkeit bei teilweise höherer Empfindlichkeit. (Fu et.al. 1999, Quake and Scherer 2000).

10 Einen Vorteil stellt die Analyse einer großen Zellzahl in geringer Zeit dar. Die Sortierung erfolgt nach unterschiedlicher Fluoreszenzfärbung der Partikel/Zellen oder die Unterscheidung nach Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Allerdings ist auch beim Einsatz von größennormierten Latexpartikeln eine Sortierung nach Größe nur in großen Schwankungsbreiten möglich. Die Auftrennung erfolgt maximal in zwei Gruppen und eine weitere Analyse der Zellen ist nur an anderen Geräten oder Versuchsvorrichtungen möglich.

15 20 Die FACS-Geräte sind sehr teuer und somit nicht für jedes Labor verfügbar.

Bei Zellsortierern auf Mikrochipbasis ist der Verbrauch an Trägerflüssigkeit geringer und damit erhält man auch eine stärker konzentrierte Zellsuspension nach dem Sortiervorgang, allerdings ist hierbei wiederum der Probendurchsatz geringer und Mikropumpen und -ventile stellen immer kritische Komponenten in Bezug auf Funktionsdauer der Geräte dar. Allerdings tritt hier auch der Vorteil der Mikrosystemtechnik zu Tage: die leichte Austauschbarkeit der defekten Module.

30 2. Die Analyse von Zellen kann klassischerweise mikroskopisch erfolgen. Durch Einsatz von Zählkammern oder Okularen mit eingezätzter Skale lässt sich eine Einteilung der Zellen nach Größe durchführen. Dabei können die Zellen durch eine Ausstrich bzw. nach Zytozentrifugation auf einen Mikroskopieobjektträger plaziert werden. Ein Laser-Scanning-

35

Mikroskop dient hier als geeignetes Mittel, weil es Zellen finden kann und später auch wiederfinden kann.

Die Mikroskopie gibt oft einen besseren Eindruck über die Morphologie der Zellen, aber die Auswertung ist oft limitiert durch niedrige Zellzahlen und schlechte Wiederfindung auf dem untersuchten Objektträger.

3. Mit speziellen Membransystemen soll eine Trennung von Zellen bestimmter Größe erreicht werden. Aufgrund der Porengröße in der Membran kommt es zum Austausch von Zellen zwischen zwei Flüssigkeitsreservoirs, wobei alle Zellen, die größer als die Pore sind, zurückgehalten werden (JP 1992000058485). Einen vergleichbaren Ansatz führten Carlson et al. (1997) durch. Sie schufen ein Gitter mit einer Porengröße von 5 µm und testeten die hydrodynamischen Eigenschaften von Blutzellen in einem Flüssigkeitsstrom. Zwischen den Poren wurden verschieden lange Kanäle (von 20-110 µm, Querschnitt 5 · 5 µm) plaziert und somit das Penetrationsverhalten der einzelnen Zelltypen anhand der Wanderungstrecke auf dem Array gemessen.

Der Einsatz von Membransystemen ist für das Aufreinigen / Aufkonzentrieren von Lösungen geeignet. Aber die Zellen auf beiden Seiten der Membran müssen wie bei 1. mit anderen, nachfolgenden Analysetechniken untersucht werden. Zu große Zellzahlen oder starke Verunreinigung der Suspensionen auch mit Eiweißen, verstopfen oder verkleben die Membran. Auch erfolgt bei so dichten Poren gerade bei vitalen Zellen des Blutsystems eine Kontaktaktivierung bestimmter Zelltypen (Thrombozyten), was einen veränderten Zustand der ursprünglichen Zelle bewirkt oder auch das Trenngut schädigen kann.

4. Für eine Vorsortierung von Partikel und Zellen wurden miniaturisierte Filter entwickelt, die sowohl eine axiale als auch laterale Auftrennung nach der Größe ermöglichen. Dafür wurden auf Silizium-Schichten Polymerwürfel aufgebracht, die dadurch ein Netzwerk mit unterschiedlicher Fliessarchitektur schufen. Durch Wahl des Abstandes zwischen dem Polymersockel konnte ein Ausschluß größerer Partikel im Flüssigkeitsstrom erreicht werden (He et al. 1999, Wilding and Kricka 1995).

Problem bei diesem Ansatz ist das geordnete Aufbringen der Trennelemente auf das Silizium. Silizium selbst lässt sich gut strukturieren. Allerdings lassen sich mit dieser Methode geringere Erhebungen und auch Polymerporen herstellen (in Nanometergröße), was konventionelle Ätztechniken nicht zulassen.

5. Durch Anlegen von elektrischen Feldern können Zellen z. B. nach ihrer Größe separiert werden. Grundüberlegung ist die negative Ladung von Zellen im Flüssigkeitsstrom, was durch pH-Variationen des umgebenden Mediums modifiziert werden kann (Li and Harrison 1997, Fiedler et al. 1998). Es wurden in Glas Kanäle mit einer Tiefe von 15 µm oder 30 µm geätzt oder mit Laser eingebrannt, die ein Sortieren der Zellen in einen rechtwinklig abzweigenden Kanal durch Anlegen eines elektrischen Feldes ermöglichen sollen.

Das Sortieren mit elektrischen Feldern ist elegant, aber nicht für hohen Probendurchsatz geeignet, da auch hier für die Trennung von zwei benachbarten Zellen ein gewisser Mindestabstand und eine gute elektrooptische Kontrolle nötig ist.

6. Partikel oder Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom durch verschiedenen breite Kanäle geleitet. Die Größe der Kanäle nimmt ab und verhindert ein Abfließen der entsprechend größeren Partikel. Die untersuchte Suspension wird von den kleineren Partikeln abgereichert. Am Schluß verbleiben die größten Partikel im Flüssigkeitsstrom (Ball and Fincher 1978).

Eine Sortierung im Flüssigkeitsstroms durch Reduktion der Kapillarbweite beinhaltet immer die Gefahr der Verstopfung, was auch bei normalem Fluß in Kapillaren häufig geschieht. Die Zellen, welche mit dieser Technik aussortiert werden, müssen nachfolgend durch andere Techniken untersucht werden.

7. Arraysysteme werden zunehmend genutzt, um mittels miniaturisierter, definierter Anordnung von definierten Molekülen oder auch Zellen mittels Hochdurchsatzverfahren zu analysieren. Zellspotarrays sind zur Messung

von DNA-Expression beschrieben worden (Ziauddin und Sabatini 2001), allerdings nicht für die Einzelzellanalyse und nicht für die Detektion von Zellsekretionsprodukten an lebenden Zellen. Mikrostrukturierte Oberflächen anderer Autoren zur Positionierung von Zellen mittels Beschichtung von Zelladhäsionsmolekülen auf Festphasen erlauben eine Positionierung von Zellen, allerdings nicht in dem nachfolgend dargestellten Präzisionsmuster (Chen et al. 1998) und unterscheiden sich von dem im folgenden dargestellten Prinzip der Sortierung grundlegend.

10 Aufgrund der bestehenden Systeme ist eine Anordnung von Einzelzellen in einem festgelegten Muster und der Nachweis der Sekretionsprodukte dieser Zellen möglich, aber bisher nicht beschrieben worden. Eine strukturierte Anordnung von Einzelzellen mittels Spotautomaten ist zwar prinzipiell denkbar, allerdings sehr aufwendig und beim Einsatz von lebenden Zellen im Routinelabor sehr kostenintensiv. Dabei werden die Zellen oft physisch verletzt oder zerstört. Weiterhin basiert das Mikroarray-Prinzip in dem Aufbringen von Flüssigkeitstropfen auf eine feste Oberfläche. Diese Menge ist nicht beliebig reduzierbar (mindestens 100 nl) und somit ist das Spotten von Einzelzellen eher als Zufall zu betrachten.

20 8. Es gibt vielfältige Anwendungen zur Analyse von flüssigen Proben durch Kapillarsysteme. In manchen wurde eine Vielzahl von Kapillaren mit verschiedenen Zu- und Abläufen zur schnellen Analyse von Nukleinsäure-haltigen Proben (Liu 2001) geschaffen. Dadurch sind auch mehrstufige Prozesse der Probenbehandlung möglich.

Andere Autoren schufen Mikrokapillaren zur Bestimmung der Beweglichkeit von Spermien (Kricka and Wilding 1995). Im ersten Fall wurde ein aktiver Transport des zu untersuchenden Materials (DNA, RNA) durch ein sehr enges Kapillarsystem realisiert, im zweiten Fall wurde die Eigenbeweglichkeit der biologischen Probe (Spermien) ausgetestet, indem nach einer gewissen Wegstrecke ein Auffangbereich eingebaut wurde.

Man unterscheidet aktive und passive Trennverfahren in Mikrokapillaren. Für aktive Verfahren mit mehreren verschiedenen Schritten wurden, bis auf die in Punkten 1-7 genannten, keine Analyse von Zellen beschrieben.

Für das passive Verfahren, das zu untersuchende Agenz bewegt sich selbst in der Flüssigkeit, sind nur gewissen Zellen oder biologische Systeme (Spermien, Mikroorganismen, Viren) in der Lage. Diese müssen bei der Untersuchung auch noch vital sein und somit sind diese Methoden auf
5 einige spezielle Anwendungen limitiert.

Ursachen der Nachteile:

Die Nachteile der verschiedenen Systeme ergeben sich einerseits aus der Notwendigkeit, die Zellen nach ihrer Größe oder anderen Markern zu erkennen und zu trennen. Bei Punkt 2 übernimmt diese Funktion das Auge
10 oder als Ersatz die Optik wie in Punkt 1.

Die Sortierung der Zellen im Flüssigkeitsstrom beinhaltet den ständig ungehinderten Fluß der Suspension und die geeignete Trennmethode (Punkte
15 3-6). Nach der Trennung verbleibt die Zelle mit oftmals vielen anderen wiederum in einer Suspension, und somit sind Einzelaussagen zu den Zellen nicht sofort möglich (Punkte 1, 3-6).

Die Schwierigkeit, lebende Einzelzellen mittels Blottechniken auf Oberflächen anzuordnen liegt in der komplizierten technischen Lösung des Spotvorganges, der aus Zelldetektion und eigentlichem Spotvorgang mittels Hochpräzisionsmechanik bestehen muß (Punkt 7). Oft ist die Wiederfindung nicht gegeben (Punkte 2,3,7), oder ein High-Throughput-Screening nicht möglich.
25

Bei der Nutzung eines Kapillarnetzwerkes zur stufenweisen Analyse von Partikeln oder Zellen stört die bestehende Beweglichkeit der zu untersuchenden Objekte. Somit muß eine sequentielle Behandlung von Zellen entweder mit einem gewissen Mindestabstand der Zellen untereinander
30 erfolgen oder alle gleichermaßen im Pool. Diese Technologie eignet sich nicht für große Populationen (über 10.000 Zellen) oder lässt keine Aussagen zu den einzelnen Zelltypen zu. Weiterhin bedeuten viele Kapillaren immer ein hohes Risiko für Verstopfung oder bei sequentiellen Behandlung ein Problem der Reinigung/Spülung, um Reste oder kontaminierende
35 Flüssigkeiten effizient zu beseitigen (Punkt 8).

- 7 -

Ziel vorliegender Erfindung ist, die physische Trennung von Zellen entsprechend ihrer Größe in einem zur späteren Analyse nach molekularen Markern (Proteine, Nukleinsäuren) geeignetem System.

5 Es muß eine Festphase geschaffen werden, an welcher eine relativ selbständige Ablagerung und definierte Anordnung von Zellen erfolgt, die eine relativ einfache Einbringung der Proben und aller Reaktionsflüssigkeiten zuläßt.

10 Die Aufgabe wird durch den Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen mit den im Anspruch 1 genannten Merkmalen gelöst.

15 Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, dass das Zellsortiersystem zumindest einen Chip, der eine von der Flüssigkeit überströmte Grundplatte mit einer Vielzahl von Vertiefungen beinhaltet, umfasst. Die Grundplatte besteht vorzugsweise zumindest teilweise aus Silizium, Glas oder Kunststoff. Die Anordnung der Zellen in den Vertiefungen erfolgt durch Sedimentation aufgrund der Gravidität und Scherkräfte im Flüssigkeitsstrom, kann aber auch durch andere Hilfsmittel wie Magnetbeads, Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch optische Manipulationen (z.B. optische Pinzetten) erfolgen. Die Zellen positionieren sich in den entsprechenden Zonen auf der Grundplatte derart, dass sich in einer Mikro-
20 kavität bestimmter Größe Zellen mit einer geringeren bis maximal gleichen Größe positionieren können.
25

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist eine die Grundplatte bedeckende Glasplatte des Chips vorgesehen, so dass eine spätere Auswertung der Zellsortierung, beispielsweise durch Fluoreszenzmikroskopie, besonders einfach erfolgen kann. Ein Abstand zwischen einer Ober-
30 kante der Vertiefungen und der Glasplatte beträgt vorzugsweise 10 µm bis 500 µm. Hierdurch können Turbulenzen im Flüssigkeitsstrom verhindert werden.

35 Ferner ist bevorzugt, dass mehrere Chips fluidisch miteinander verbunden sind. Derartige modulare Systeme erlauben eine einfache und schnelle

Anpassung des Zellsortiersystems an veränderte Einsatzbedingungen. Die Adaption kann durch Weg-/Aufnahme oder Ersatz einzelner oder mehrerer Chips und/oder Änderung eines Schaltbild der verbundenen Chips erfolgen.

5

Weiterhin ist bevorzugt, dass eine Größe der Vertiefungen so vorgegeben ist, dass sie kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 1 bis 100 μm , insbesondere 5 bis 28 μm , aufnehmen können. Die Durchmesser entsprechen den typischen Abmessungen biologischer Mikrosysteme. Mikropartikel mit kleineren Abmessungen werden in der Regel schon durch Adhäsion auf der gesamten Oberfläche der Grundplatte gebunden. Größere Objekte erfordern bereits zu große Fluidströme für den Transport, wobei die Gefahr der Bildung von Turbulenzen zunimmt, die eine geordnete Anordnung der Objekte in den Vertiefungen behindert.

15

Bevorzugt ist ferner, dass Vertiefungen unterschiedlicher Größe vorhanden sind, die insbesondere in Strömungsrichtung der Flüssigkeit mit ansteigender Größe angeordnet sind. Auf diese Weise lassen sich Fehlbelegungen der Vertiefungen mit zu kleinen Objekten gezielt vermeiden. Günstig ist es dabei, wenn die Vertiefungen gleicher Größe jeweils in einem gemeinsamen Feld auf einer Grundplatte angeordnet sind. Eine Dichte der Vertiefungen liegt vorzugsweise im Bereich von 10.000 bis 1.000.000 pro cm^2 , insbesondere 33.000 bis 440.000 pro cm^2 . Mit den genannten Maßnahmen lassen sich in kurzer Zeit sehr große Mengen an Zellen auftrennen und in separat einer Analytik zugänglichen Bereichen binden.

25

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung zeichnet sich das Zellsortiersystem dadurch aus, dass ein Zuleitungssystem zur gleichförmigen Beflutung der strukturierten Flächen Flüssigkeit, dessen Zu- und/oder Ablaufkanäle sich insbesondere deltaförmig aufweiten, vorhanden ist. Hierdurch werden Verwirbelungen vermieden und somit ein homogener Fluss der Zellen über die gesamte Feldbreite erreicht.

30

Bevorzugt ist weiterhin, dass die Vertiefungen in Mustern auf der Grundplatte angeordnet sind, die ein Überrollen des Feldes auf den Stegen zwischen zwei benachbarten Vertiefungen verhindert. Dies kann insbesondere

35

re dadurch erfolgen, dass die Vertiefungen in Strömungsrichtung zueinander versetzt angeordnet sind. Diese Maßnahme unterstützt die Sortierung der Zellen und trägt zur Erhöhung der Beladungsdichte der Vertiefungen mit den Zellen bei.

5

Gemäß vorliegender Erfindung werden auf Silizium-, Kunststoff- oder Glasoberflächen mittels Ätztechniken hintereinander liegende Zonen mit gleichmäßig verteilten Vertiefungen definierter, aber unterschiedlicher Größe aufgebracht. Die netzartig verteilten Vertiefungen dienen zur
10 strukturierten Anordnung von Einzelzellen und erleichtern dadurch eine Wiederfindung bei der abschließenden Analyse. Bei gekammer-ten/gedeckelten Systemen wird die zu untersuchende Zellsuspension durch Mikrofluidikanschlüsse und -zuleitungen an die strukturierten Oberflächen herangeführt.

15

Die Vorteile der vorliegenden Lösung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Simultane Anordnung von Zellen in einer erhöhten Zelldichte (bis zu 1
20 Million Zellen/cm²) gegenüber konventionellen Zytospotverfahren.

2. Größenabhängige Anordnung von sehr vielen Zellen (bis zu 1 Million) als Einzelzellen und damit Sortierung großer Zellpopulationen in bestimmte Zelltypen wird möglich.

25

3. Geordnete Immobilisierung von Zellen wird möglich und damit auch eine hohe Wiederfindungsrate durch optische Verfahren (z.B. Mikroskopie/Laserscanning-Mikroskopie) nach verschiedenartiger Behandlung (Spül- und Waschschr-
30 itte, thermische Behandlung bei PCR und Hybridisierungstechniken).

4. Durch die räumliche Separation der Einzelzellen können lokal getrennte Untersuchungen sehr vieler verschiedener Zellen (Lymphozyten, Makrophagen, zirkulierende Tumorzellen, Zelllinien) durchgeführt werden.
35

- 10 -

5. Zeitabhängige Prozesse können sequenziell an einer und derselben Zelle durchgeführt und analysiert werden (Echtzeitanalyse).
6. Die hohe Zellzahl bei der Analyse auf dem Chip erlaubt eine gute statistische Auswertung der untersuchten Zellpopulation (Auswertung von einer Million Zellen nach molekularen Markern (Oberflächenproteine, Nukleinsäuren, auch in Kombination und nach mehreren) und Größe).
7. Unterstützung des Sortierprozesses im Flüssigkeitsstrom durch vielfältige andere Methoden (Latexpartikel, Magnetbeads, optische Pinzetten) ist machbar.
8. Untersuchung und Sortierung von lebenden und fixierten Zellen mit dem Chip ist möglich.
9. Die Analyse der immobilisierten Zellen ist durch Immunophänotypisierung bzw. durch in situ-Detektion (PCR, Hybridisierung) oder durch Kombination beider Techniken möglich.
- Die Vorgehensweise bei der Zellsortierung und nachfolgenden Analytik kann wie folgt ablaufen:
 1. Die Zellen müssen in einer Suspension aufgenommen werden.
 2. Die Zellen werden nativ benutzt oder einer Vorbehandlung (z.B. Fixierung, Bindung eines Antikörpers) unterzogen.
 3. Durch die entsprechenden Mikrofluidikanschlüsse werden die Zellen in den gekammerten Chip gespült. Die Einspülung der Zellen kann z.B. durch eine Mikroliterspritze manuell oder unter Hilfe einer Dosierpumpe erfolgen.
 4. Die Anordnung der Zellen erfolgt durch Sedimentation aufgrund der Gravidität und Scherkräfte im Flüssigkeitsstrom, kann aber auch durch andere Hilfsmittel wie Magnetbeads, Anlegen eines elektrischen Feldes oder durch optische Manipulationen (z.B. optische Pinzetten) erfolgen

- 11 -

bzw. unterstützt werden. Die Zellen positionieren sich in den entsprechenden Zonen auf dem Chip derart, daß sich in einer Vertiefung bestimmter Größe Zellen mit einer geringeren bis maximal gleichen Größe positionieren können.

5

5. Die Zellen werden mit verschiedenen Fixanzien gespült und an der Stelle ihrer Ablagerung fixiert. Die lokale Anbindung der Zellen kann auch durch eine vorherige Beschichtung der Chipoberfläche verstärkt oder erreicht werden.

10

6. Der gesamte Kammerinhalt wird mehrfach mit Waschlösungen gespült, um Fixantienreste und unfixierte Zellen abzuspielen. Nach diesem Sortierschritt sind folgende Behandlungen zur Untersuchung der Zellen möglich:

15

7. Der Chip wird mit Reagenzlösungen (z.B. Lösung für PCR oder Hybridisierung) gefüllt und die Fluididanschlüsse mit Schlauchklemmen verschlossen.

20

8. Der gesamte Chip mit den immobilisierten Zellen kann dann einer thermischen Behandlung (bis zu 95°C) wie z.B. bei einer Polymerase-Kettenreaktion (engl. PCR) oder einer Hybridisierung unterzogen werden.

25

9. Die Reaktionslösung wird durch Spülen mit verschiedenen Waschlösungen entfernt.

30

10. Der Chip kann nach verschiedenen Fluoreszenzen (grün z.B. FITC, rot z.B. Texas Rot, blau z.B. DAPI, weiß z.B. Fotolumineszenz) gescannt werden. Ein Laser-Scanning-Mikroskop ist besonders geeignet, da dieses Meßverfahren eine hohe Analyserate mit einer hohen Wiederfindungsrate für die immobilisierten Zellen besitzt.

35

11. Der Scanvorgang kann auch zwischendurch nach verschiedenen anderen Waschvorgängen oder Behandlungen durchgeführt oder wiederholt werden.

Die Erfindung betrifft demnach ein Zellsortiersystem zur Vereinzelung von Partikeln/Zellen aus großen Populationen und Sortierung nach Größe an mikrostrukturierten Festphasen.

5 Dabei werden zur effektiven Separierung und Anordnung von Partikeln/Zellen oder Mikroorganismen lebende oder behandelte Einzelzellen oder andere Partikel aus großen Populationen an strukturierten Festphasen (Silizium, Glas, Plastik) nach einem vorgegebenen Muster in Vertiefungen mit bestimmter Größe vereinzelt.

10

Die Auftrennung der Partikel oder Zellen erfolgt durch Sedimentation nach der Gravidität und Scherkräften aus einem Flüssigkeitsstrom heraus, ohne weitere Hilfsmittel, kann aber durch Anlegen eines magnetischen oder elektrischen Feldes bzw. durch Licht (z.B. optische Pinzetten) verstärkt werden.

15

Das Zellsortiersystem ist zur simultanen Auftrennung sehr großer Populationen (z.B. 1 Million Zellen) in kurzer Zeit 1-10 min nach der Größe für eine nachfolgende Analyse als Einzelspots geeignet.

20

Das Zellsortiersystem dient zur simultanen Anordnung sehr großer Zellpopulationen für eine hohe Wiederfindungsrate bei sequentiellen Analysen. Durch die Auswertung wird eine hohe statistische Genauigkeit der untersuchten Probe erreicht.

25

Die Separation kann in gekammerten (gedeckelten) Vorrichtungen mit Mikrofluidikanschlüssen oder auch in geöffneten Systemen, mit oberflächlichem Flüssigkeitsstrom, erfolgen.

30

Durch Analyse des Separationsergebnisses (z.B. durch Mikroskopie) können die Beladung der Kavitäten mit Einzelzellen von Doppelbeladungen (zwei oder mehr Partikel) unterschieden werden.

35

Bei Verwendung geeigneter Materialien können mit den separierten Zellen oder Partikeln thermische Reaktionen durchgeführt werden (Silizium bis ca. 450°C).

Die Analyse der angeordneten Partikel/Zellen erlaubt lokal getrennte (Abstand zwischen zwei Spots ab 5 µm) Untersuchungen nach molekularen Markern, wie genetischem Material (DNA, RNA) oder zellulären Eiwei-
ßen. Aber auch physikalisch-chemische Untersuchungen wie Chemikali-
enresistenz, Einfluss von Licht (UV, Röntgenstrahlen), Temperatur oder
Druck (Luftdruck) können durchgeführt werden.

Nachfolgend wird die Erfindung in zwei Ausführungsbeispielen und anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Figur 1 ein Zellsortiersystem nach einer ersten Variante,

Figur 1a fünf Ausschnitte A-E aus einem Zellsortiersystem gemäß Figur 1,

Figur 2 ein Zellsortiersystem nach einer weiteren Variante,

Figur 3 eine schematische Darstellung der Zellsortierung und

Figur 4 beispielhafte Untersuchung einer sortierten Zelle in einer Mikrokavität.

Figur 1 zeigt in einer schematischen Explosionsdarstellung ein Zellsortiersystem, das einen Chip 10 umfasst. Der Chip 10 gemäß Figur 1 besteht aus einer Siliziumgrundplatte 12, auf welche durch anodisches Bonden eine Glasplatte 14 aufgebracht wurde, und somit ein gekammertes System entsteht.

Die Grundplatte 12 kann sowohl durch Ätztechniken als auch durch Abformtechniken erzeugt werden. Als Material kommen Silizium, Glas oder auch Plastik in Betracht. Zur Herstellung von gekammerten Systemen erfolgt Bonden oder Verkleben bei Plastikwerkstoffen der Ober- und Unterplatte 12, 14.

Gekammerte Chips 10 sind für den gewollten Siebeffekt über den Mikrokavitäten bestimmter Größe besser geeignet als offene Systeme.

Die Glasplatte 14 sollte aus optischem Glas sein, damit eine spätere Auswertung der Zellsortierung durch Fluoreszenzmikroskopie erfolgen kann.

In die Siliziumplatte sind vier Felder 16, 18, 20, 22 mit je einem deltaähnlichen Zuleitungssystem 24 als Zu- und Ablauf von Flüssigkeiten geätzt.

Das flüssigkeitzuführende Delta besteht im Beispiel aus Kanälen mit einer einheitlichen Ätztiefe von 60 μm und einer Verzweigungsrate von 2^6 , d.h. 1 beginnender Kanal auf endgültig 128 Kanäle. Grundprinzip ist die gleichförmige Beflutung der strukturierten Flächen, um Verwirbelungen zu vermeiden und somit einen homogenen Fluß der Zellen/Partikel über die gesamte Feldbreite zu erreichen.

Das abfließende Delta beginnt spiegelsymmetrisch mit 128 Kanälen und verjüngt sich auf 1 Kanal. Am Anfang und Ende des jeweiligen Einzelkanals ist ein Mikrofluidikanschluß 28, 30 eingeklebt, welcher durch ein Loch in der abdeckenden Glasplatte 14 die Zuführung von Flüssigkeiten zu den deltaförmigen Kapillarsystemen ermöglicht.

Zwischen den beiden Deltas befinden sich die vier Felder 16, 18, 20, 22 mit einer unterschiedlichen Anzahl an geätzten Vertiefungen unterschiedlicher Größe. Auf dem ersten Feld 16 befindet sich ein Array mit einer Ätztiefe, die kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 5 μm aufnehmen kann (Dichte 440.000/ cm^2). Das zweite, dritte und vierte Feld 18, 20, 22 enthält analog Vertiefungen mit nachfolgend aufgeführter Größe und Dichte: 10 μm , Dichte 190.000/ cm^2 , 16 μm , Dichte 92.000/ cm^2 , 28 μm , Dichte 33.000 / cm^2 .

Die Anordnung der Felder 16, 18, 20, 22 erfolgt in anwachsender Größe der Vertiefungen (von 5 bis 28 μm). Der prozentuale Anteil von Vertiefungen in Feld 16, 18, 20, und 22 sollte sich wie 10%, 30%, 50% und 10% verhalten. Diese Aufteilung resultiert aus dem Bestreben mit diesem

- 15 -

Chip 10 auch Untersuchungen der Zellen aus Vollblut durchzuführen. Hierdurch ergibt sich folgende Aufteilung (siehe Tabelle 1).

5 Zur Verdeutlichung des Aufbaus des Chips 10 sind der Figur 1a fünf vergrößerte Ausschnitte A-E zu entnehmen.

Ausschnitt A zeigt Zulaufkanäle 25 des Zuleitungssystems 24 mit in Flüssigkeit eingebundenen Luftblasen 27.

10 Ausschnitt B zeigt Ablaufkanäle 29 des Zuleitungssystems 24 mit netzförmig angeordneten Vertiefungen 31.

Ausschnitt C ist eine Darstellung des anisotropen Ätzens in den netzförmig angeordneten Vertiefungen 31.

15 Die Ausschnitte D und E zeigen jeweils den Übergangsbereich zwischen den Feldern 20, 22 bzw. 16, 18, die Vertiefungen verschiedener Größe beinhalten.

20 Das Zellsortiersystem gemäß Figur 2 besteht aus zwei in Reihe geschalteten Chips 40, 42, gleicht aber sonst im Aufbau dem des vorhergehenden Ausführungsbeispiels. Die Chips 40, 42 beinhalten zwei Felder 44, 46 auf. Allerdings sind die Felder 44, 46 mit den unterschiedlich großen Kavitäten nicht nacheinander in einem Kammersystem angeordnet. Zu jedem
25 Feld 44, 46 führt ein eigenes deltaähnliches Zuleitungssystem 48, 50 als Zu- und Ablauf von Flüssigkeiten. Zwei Felder 44, 46 werden durch einen Schlauch verbunden, wobei wiederum die Zellsuspension erst über das Feld 44 mit den kleineren Kavitäten fließt und dann erst auf das Feld 46 mit den größeren Vertiefungen. Diese Anordnung lässt sich auf beliebig
30 viele Felder erweitern.

Tabelle 1: Größe der Kavitäten auf den Feldern des Chips 10 und entsprechende Zellgrößen mit prozentualer Verteilung im Blut

Feld-Nr.	Größe der Zellen, welche in die Kavität passen	Zelltypen/Bestandteile insbesondere aus Vollblut	Mittlerer theoretischer Prozentsatz (in %)
1	bis 5µm	Thrombozyten Mycoplasmen, Viren, Myofibroblasten	10
2	bis 10µm	Lymphozyten, Erythrozyten*	30
3	bis 16µm	Granulozyten, Fibroblasten Plasmazellen	50
4	bis 28µm	Monozyten, Hepatozyten, Spermien, Granulozyten	10

- 5 * Erythrozyten sollten nach vorangegangener Lyse des Vollblutes nicht mehr vorhanden sein.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von detaillierten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

10

Der Testablauf wird am Chip 10 folgendermaßen durchgeführt:

- 15 Aus einer 2,8-ml Monovette wurden 2ml-EDTA-Vollblut entnommen und die Erythrozytenlyse mit der 4-fachen Menge eiskaltem Lysepuffer in Eis durchgeführt. Nach Zentrifugation und 3fachen Waschschr

- 20 Für eine anschließende Behandlung der Zellen wurden diese mit Permea-Fix (Ortho Diagnostics, Neckargmünd) fixiert und bis zur endgültigen Verwendung in PBS-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

5 Vor dem Auftragen auf den Chip 10 wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Propidiumjodid als Kernfarbstoff bewirkt eine Rotfluoreszenz der Zellen, bei gleichzeitiger Grünfluoreszenz. DAPI bewirkt als Kernfarbstoff eine violett-blaue Fluoreszenz der Zellen und zeigt keine Grünfluoreszenz.

10 Die Zellen wurde mit je einem Farbstoff (DAPI oder Propidiumjodid) gefärbt und dann mit grün-gelb fluoreszierenden Latex-Kugeln (4,9 µm Durchmesser) versetzt.

Der gekammerte Chip 10 wurde mit 1 ml PBS-Puffer gefüllt und gespült. Dafür wurde eine Hamilton-Glasspritze verwendet.

15 Eine vorherige Spülung des gekammerten Chips 10 mit einer Proteinlösung (z.B. Protein A) ist möglich, welches sich an die Siliziumoberflächen bindet und eine bessere Anhaftung von Zellen oder später benötigten Antikörper bewirkt.

20 Das Zellsortiersystem wurde dann mit einer Zellsuspension von etwa 2×10^6 Zellen pro 1000 µl gefüllt. Für die eigentliche Beschichtung sind 100-200 µl ausreichend. Die Suspension muß mit einer Flussrate von max. 100-400 µl/min eingespritzt werden, damit eine geordnete Ablagerung der Zellen erfolgen kann.

25 Die Anordnung der Zellen erfolgt durch die Gravidität im Flüssigkeitsstrom. Die Zellen 50, 52, 54 positionieren sich entsprechend ihrer Größe in die vorbereiteten Vertiefungen 60, 62 ähnlicher Größe (Figur 3). Die größeren Zellen 54 oder Partikel rollen über die kleineren Vertiefungen 60, 62 bis zu dem Feld mit den entsprechenden Vertiefungen (hier nicht dargestellt). Deshalb müssen in Flußrichtung erst die kleinen Kavitäten
30 60, 62 vorgesehen sein, damit sich die kleinen Partikel 50, 52 als erstes ablagern, und nur die größeren Partikel 54 im Flüssigkeitsstrom verbleiben.

35 Die Zellsuspension darf bei diesem Chip 10 nicht mehr als 300.000 Zellen von einem Größenbereich (siehe Tabelle 1), insgesamt unter 1 Mio.

Zellen, enthalten, da sonst zwangsmäßig kleinere Zellen in den nächsten Bereich gespült werden und sich dort ablagern.

5 Ziel ist das Erreichen einer möglichst hohen Dichte an Zellen aus dem gleichen Größenbereich, wobei eine möglichst hohe Zahl von Mikrovertiefungen mit nur einer Zelle gefüllt sein sollen. Erreicht wird diese Zelldichte durch eine möglichst dichte Anordnung der Mikrokavitäten. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Anordnung der Mikrokavitäten in speziellen, z.T. versetzten Mustern selbst, dadurch soll ein Überrollen des
10 Sortierfeldes auf den Stegen zwischen zwei benachbarten Kavitäten verhindert werden.

Eine Vorbehandlung der Siliziumoberfläche führt zu veränderten Eigenschaften (Ladung, Hydrophobizität) der Oberfläche.

15 Das Anlegen eines Magnetfeldes oder Einsatz optischer Verfahren kann das Festhalten oder Plazieren der Zellen in den Vertiefungen sichern oder unterstützen.

Die endgültige Trennung der Zellen entsprechend ihrer Größe erfolgt
20 durch die nachfolgenden Waschschrte. Nicht in den Vertiefungen positionierte Zellen werden nach Anlegen eines geeignet starken Flüssigkeitsstromes wieder entfernt. Bei Waschschrten sollte einerseits das Auswaschen von in den Vertiefungen befindlichen Zellen durch Wirbelbildung vermieden werden, andererseits eine Schädigung der Zellen durch einen
25 massiven Flüssigkeitsstrom ausgeschlossen sein. Strömungsraten von 0,3-0,01 ml pro Sekunde haben sich als sinnvoll herausgestellt. Von wesentlicher Bedeutung für das Vermeiden von Verwirbelungen und damit dem Herauswaschen von Zellen ist der Abstand zwischen der Oberkante der Vertiefungen und einer mikroskopierfähigen z.B. Quarzglasoberfläche.
30 Bei Abständen ab 500 µm treten sehr starke Verwirbelungen auf, bei Abständen unter 10 µm ist der Flüssigkeitsstrom mit Zellen stark beeinträchtigt. Mehrfache, pulsartige Beladungs- und Waschzyklen erhöhen die Dichte und die Effektivität der Beladung. Die Waschschrte sind ebenfalls in pulsartigen Zyklen effektiv. Waschmengen von insgesamt 1-2 ml
35 sind bei pulsartigem Waschen ausreichend.

Bei Auftrennung unfixierter Zellen erhöht eine Anreicherung der Waschlösung mit Zellkulturmedium oder Eiweiß (Albumin 0,1-1%) die Vitalität der Zellen während der anschließenden Tests.

5 Mikroskopiervorgang des Zell-Arrays nach verschiedenen Fluoreszenzen (grün z.B. FITC, rot z.B. Texas Rot, blau z.B. DAPI, weiß z.B. Fotolumineszenz). Für diese Analyse muß immer das Auflichtverfahren genutzt werden, da die Grundplatte aus Silizium für das in der Mikroskopie häufig genutzte Durchlichtprinzip nicht geeignet ist. Bei Overlay-Darstellungen
10 kann die Zuordnung von zellulärer Fluoreszenz zur strukturierten Siliziumoberfläche erfolgen. Hierdurch können Doppelbeladungen (mehr als eine Zelle pro Kavität) ausgeschlossen werden.

Ein Laser-Scanning-Mikroskop ist dahingehend geeignet, da dieses Meßverfahren eine hohe Durchsatzrate mit einer hohen Sensitivität für die Zellmarker besitzt. Andererseits treten innerhalb der Mikrovertiefung eine Reihe von Reflexions- und Streulichteffekten auf, die zur Auswertung herangezogen werden können und die die Sensitivität erhöhen können.
15 Ein nicht konfokaler Meßmodus ist deshalb sinnvoll, weil ein Großteil der Vertiefungsoberfläche, die zur Messung genutzt werden kann, in der Vertikalen angeordnet ist, damit nahezu nur zu Reflexions- und Streulicht führt, was bei konfokaler Messung dann nahezu ausgeblendet werden würde. Bei einer 50fachen Mikroskopvergrößerung können bei 10 µm Mikrowellgröße etwa 14.000 Vertiefungen gleichzeitig analysiert werden.
20 25

Nach der größenbedingten Anordnung der Zellen auf der strukturierten Siliziumoberfläche können die Zellen mit traditionellen Nachweismethoden untersucht werden.

30 Hat man native Zellen 70 aufgetrennt, kann jetzt eine Inkubation mit Nährmedien erfolgen, so daß die Zellen 70 lokal positioniert, eine Stoffwechselaktivität entfalten (Figur 4). In ihrem Umfeld oder direkt in ihnen können dann Eiweiße oder andere Sekretionsprodukte 72 detektiert werden. Dies erfolgt im allgemeinen mit spezifischen Antikörpern 74, 76, 78,
35 die beispielsweise gegen die Zelloberfläche, gegen Kernproteine oder die Sekretionsprodukte 72 wirken.

- 20 -

Hierfür können die bereits sedimentierten Zellen 70 noch mehrfach gewaschen werden, auch um diese selbst aus den Mikrokavitäten 80 zu entfernen. Somit bleiben nur deren Sekretionsprodukte 72 in den Vertiefungen 80 zurück.

Will man die Zellen direkt nachweisen, kann man durch Spülen des Chips mit Fixantien die Anheftung und Stabilität der Zellen in den Vertiefungen verstärken.

Für molekularbiologische Untersuchungen können die sortierten Zellen durch verschiedene Techniken untersucht werden. Es können alle gängigen Fixierungsschritte durchgeführt werden, um eine anschließende In-situ-Diagnostik durch Hybridisierung spezifischer Gensonden zu ermöglichen. Aufgrund der guten Wärmeleitfähigkeit der Siliziumwafer können auch temperierte Reaktionen, wie bei den Untersuchungen mit der Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. Hierbei müssen nur die Mikrofluidikanschlüsse der Reaktionskammer gut verschlossen werden, um eine Verdampfung der Reaktionslösungen zu verhindern. Die Kontaktstellen beim anodischen Bonden des Glases auf Silizium lassen Temperaturbehandlungen bis 450°C zu, allerdings sind die eingeklebten Mikrofluidikanschlüsse nur bis ca. 100°C stabil.

In einem zweiten Ausführungsbeispiel wird der Testablauf am Zellsortiersystem gemäß Figur 2 folgendermaßen durchgeführt:

Aus einer 2,8-ml Monovette wurden 2ml-EDTA-Vollblut entnommen und die Erythrozytenlyse mit der 4-fachen Menge eiskaltem Lysepuffer in Eis durchgeführt. Nach Zentrifugation und 3fachen Waschschritten wurde das Pellet (weiße Blutzellen) in PBS-Puffer resuspendiert. Die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) sollten nicht, oder nur noch in vernachlässigbar geringer Menge im Ansatz vorhanden sein.

Für eine anschließende Behandlung der Zellen wurden diese mit Permea-Fix (Ortho Diagnostics, Neckargmünd) fixiert und bis endgültigen Verwendung in PBS-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

Vor dem Auftragen auf den Chip wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Propidiumjodid als Kernfarbstoff bewirkt eine Rotfluoreszenz der Zellen, bewirkt gleichzeitig auch eine Grünfluoreszenz. DAPI bewirkt als Kernfarbstoff eine violett-blaue Fluoreszenz der Zellen und zeigt keine Grünfluoreszenz.

Die Zellen wurde mit je einem Farbstoff (DAPI oder Propidiumjodid) gefärbt und dann mit grün-gelb fluoreszierenden Latex-Kugeln (4,9 µm Durchmesser) versetzt.

Zwei einzelne Felder 44, 46 auf dem Siliziumwafer wurden durch einen Schlauch verbunden und mit 1ml PBS-Puffer gefüllt und gespült (Figur 2). Dafür wurde eine Hamilton-Glasspritze verwendet.

Eine Zellsuspension von etwa 2×10^6 Zellen pro 1000 µl wurde, beginnend mit dem Feld 44 welches die kleineren Kavitäten enthält, injiziert. Für die eigentliche Beschichtung sind 100-200 µl ausreichend. Die Suspension muß mit einer Flußrate von max. 100-400 µl/min eingespritzt werden, damit eine geordnete Ablagerung der Zellen erfolgen kann. Erst wurde nur die erste Kammer gefüllt und dann weiter injiziert, bis auch die zweite Kammer gefüllt war. Die leichte Verzögerung erhöhte die Sedimentation der kleineren Zellen im ersten Sortierfeld.

Die weitere Injektion wirkte gleichzeitig als Spülschritt und bewegte alle größeren Zellen auf das zweite Feld 46. Unter dem Mikroskop waren anfangs rote Zellen und grüne Beads auf Feld 44 zu sehen. Nach der weiteren Injektion und einem Waschschrift verschwanden alle rotgefärbten Zellen von Feld 44 und es blieben nur grünfluoreszierende Beads zurück. In Feld 46 fanden sich die roten Zellen wieder und nur ganz vereinzelt einige Beads, die bei einer besseren Optimierung der Suspensionen (weniger Beads im Ansatz) nicht mehr nachweisbar sind.

Somit bietet der Chip 10 der Figur 1 ein geschlossenes System für die komplette Auftrennung sehr vieler Zellen in alle Größengruppen, aber aufgrund der räumlichen Nähe der einzelnen Sortierfelder ohne spezielle

Barriere kommt es zum Übertritt von kleineren Zellen auf das nächste Feld.

5 Beim Zellsortiersystem gemäß Figur 2 verlängert sich der Auftrennungsweg und die benötigte Menge an Zellsuspension durch die Schlauchverbindungen, aber die schrittweise Injektion der Zellen, ein Feld nach dem anderen, erhöht die Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen und ergibt eine höhere Sortiergenauigkeit. Zusätzlich kann sehr leicht der Sortiermodus festgelegt oder variiert werden, je nach Verbindung der gewünschten Sortierkammern.

10 Durch unterschiedliche Beschichtung von Sortierfeldern mit Eiweißen oder Antikörpern oder anderen Fängermolekülen, lassen sich sogar Zellen gleicher Größe auftrennen, was beim Chip 10 schwer machbar ist.

15 Dargestellt wurde ein Verfahren zur größenabhängigen Separation von verschiedenen Zellpopulationen auf einem strukturierten, gekammerten Festphasenchip (z.B. Silizium-Glas) mit ein mikrofluidischen Spülsystem. Die strukturierten Festphasen erlauben eine geordnete Anordnung von
20 Zellen entsprechend deren Größe in einer sehr hohen Dichte (150.000 pro cm^2). Unterstützt werden kann die Separation durch Einsatz magnetischer Beads oder andere physikalische Prinzipien wie lasergesteuerte Auslenkung ("optische Pinzetten") von Zellen. Die Zellen können dann ohne und nach Fixierung mit verschiedenen Methoden z.B. durch Immunophänotypisierung mit spezifischen Antikörpern, oder durch In situ-Detektion
25 durch Hybridisierung mit einer spezifischen Oligo-Nukleotid-Sonde oder nach vorangegangener Amplifikation von genetischem Material (DNA, RNA) mit einer intrazellulären Polymerase-Kettenreaktion näher charakterisiert werden.

Bezugszeichenliste:

10, 40, 42	-	Chip
12	-	Grundplatte
14	-	Platte
16, 18, 20, 22, 44, 46	-	Feld
24, 48, 50	-	Zuleitungssystem
25, 29	-	Kanälen
28, 30	-	Mikrofluidanschlüsse
31, 60, 62, 70, 80	-	Vertiefungen

Patentansprüche

1. Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass das Zellsortiersystem zumindest einen Chip (10, 40, 42), der eine von der Flüssigkeit überströmte Grundplatte (12) mit einer Vielzahl von Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) beinhaltet, umfasst.
2. Zellsortiersystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine die Grundplatte (12) bedeckende Platte (14) vorhanden ist.
3. Zellsortiersystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Abstand zwischen einer Oberkante der Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) und der Platte (14) 10 µm bis 500 µm beträgt.
4. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) in Strömungsrichtung zueinander versetzt angeordnet sind.
5. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Chips (10, 40, 42) fluidisch miteinander verbunden sind.
6. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass eine Größe der Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) so vorgegeben ist, dass sie kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 1 bis 100 µm, insbesondere 5 bis 28 µm, aufnehmen können.
7. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) unterschiedlicher Größe vorhanden sind.

8. Zellsortiersystem nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) mit ansteigender Größe in Strömungsrichtung der Flüssigkeit angeordnet sind.
- 5 9. Zellsortiersystem nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) gleicher Größe jeweils in einem gemeinsamen Feld (16, 18, 20, 22, 44, 46) auf der Grundplatte (12) angeordnet sind.
- 10 10. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass eine Dichte der Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) im Bereich von 10.000 bis 1.000.000 pro cm^2 , insbesondere 33.000 bis 440.000 pro cm^2 , liegt.
- 15 11. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundplatte (12) zumindest teilweise aus Silizium, Glas oder Kunststoff besteht.
- 20 12. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zuleitungssystem (24, 48, 50) zur gleichförmigen Beflutung der strukturierten Flächen mit Flüssigkeit vorhanden ist.
- 25 13. Zellsortiersystem nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass sich ein Zu- und/oder Ablauf des Zuleitungssystems (24, 48, 50) deltaförmig aufweitet.
- 30 14. Zellsortiersystem nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der Zu- und/oder Ablauf aus Kanälen (25, 29) besteht, die sich verzweigen bzw. verjüngen.
- 35 15. Zellsortiersystem nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Zuleitungssystem (24, 48, 50) Mikrofluidanschlüsse (28, 30) umfasst.

- 5 16. Zellsortiersystem nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) in Mustern auf der Grundplatte (12) angeordnet sind, die ein Überrollen des Feldes (16, 18, 20, 22, 44, 46) auf den Stegen zwischen zwei benachbarten Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) verhindert.
- 10 17. Zellsortiersystem nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel zum Festhalten oder Platzieren von Zellen in den Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) vorhanden sind.
- 15 18. Zellsortiersystem nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundplatte (12) aus Silizium ist und die Siliziumoberfläche mit einer Proteinlösung beschichtet ist.
- 20 19. Zellsortiersystem nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundplatte (12) aus Silizium ist und die Siliziumoberfläche derart behandelt ist, dass sich deren Ladung und Hydrophobizität geändert hat.
- 25 20. Zellsortiersystem nach den Ansprüchen 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Platte (14) lichtdurchlässig ist.
21. Zellsortiersystem nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Platte (14) aus Glas ist.

1 / 4

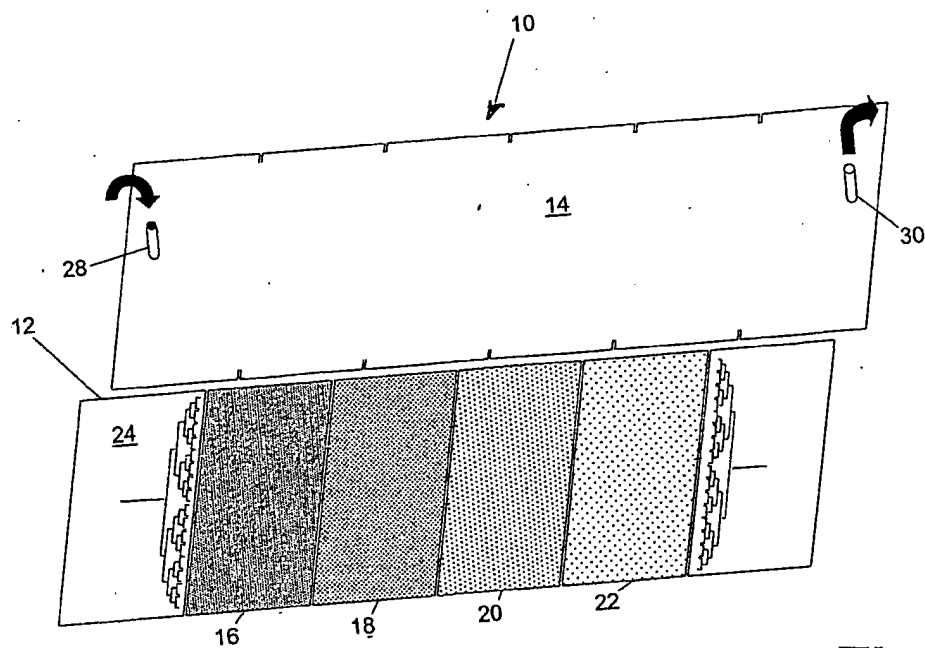


Fig. 1

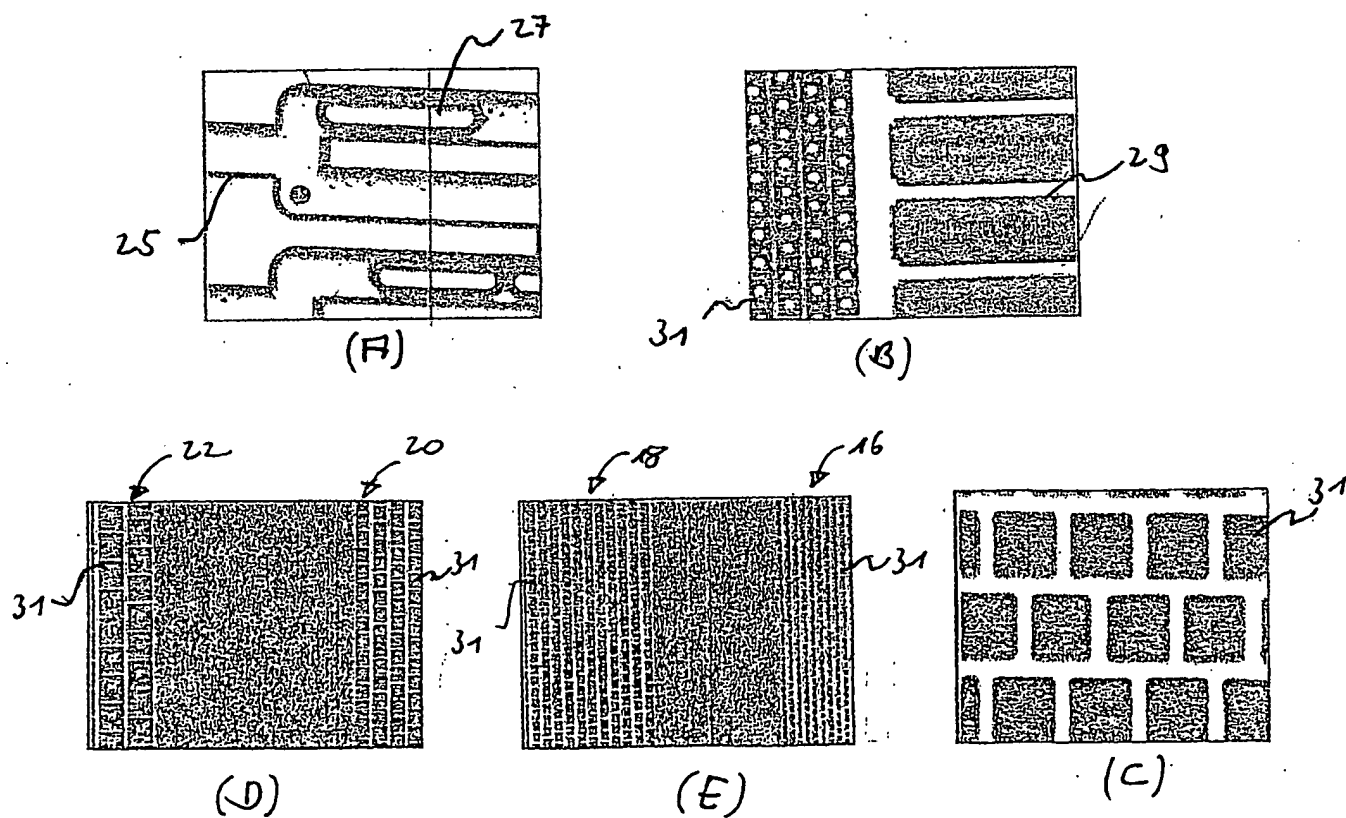
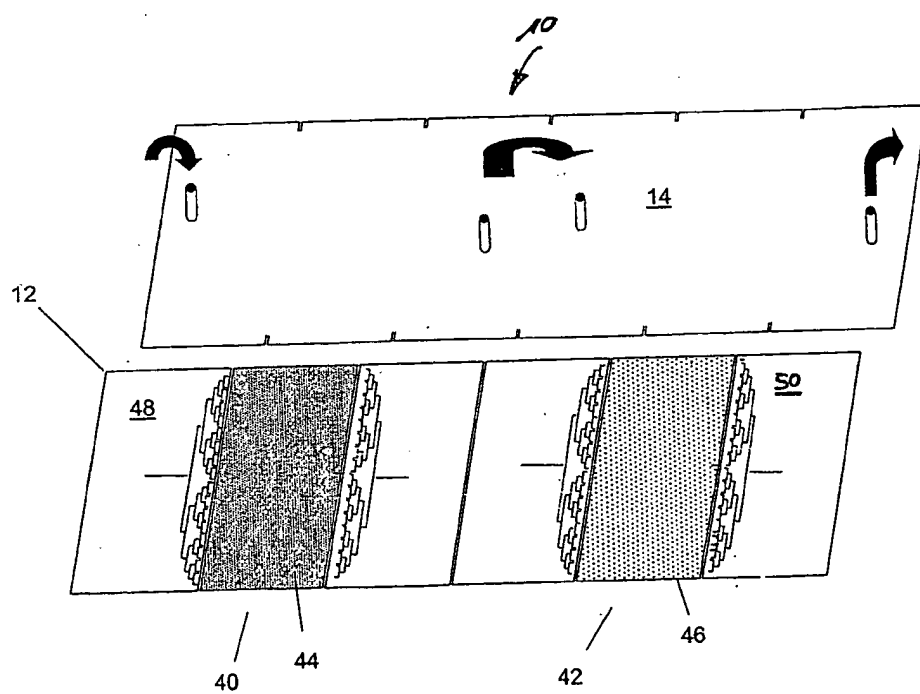
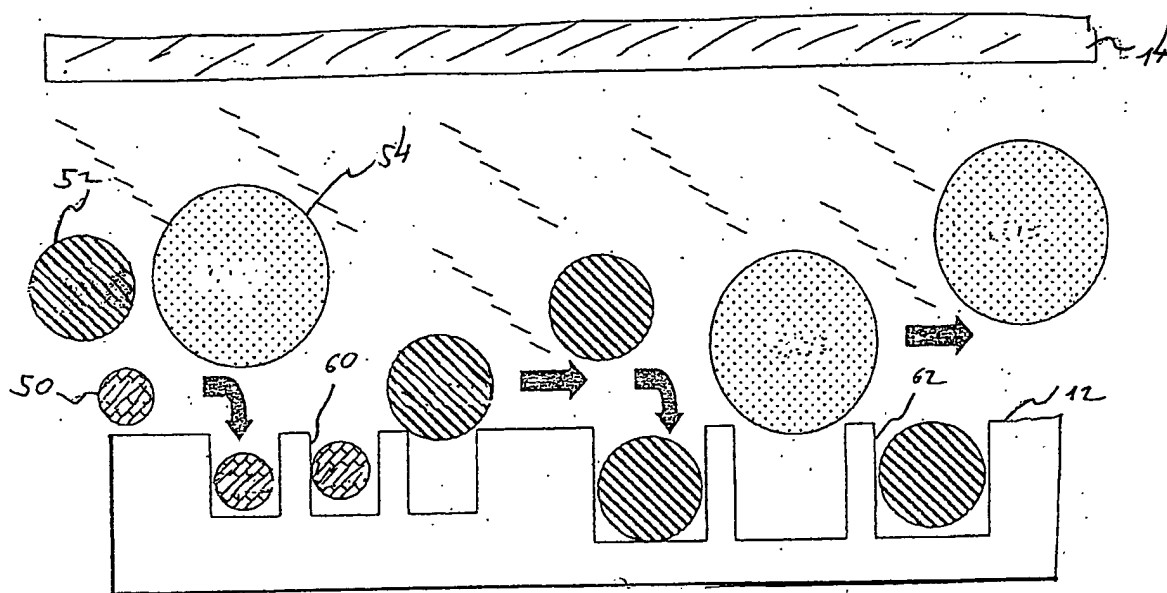
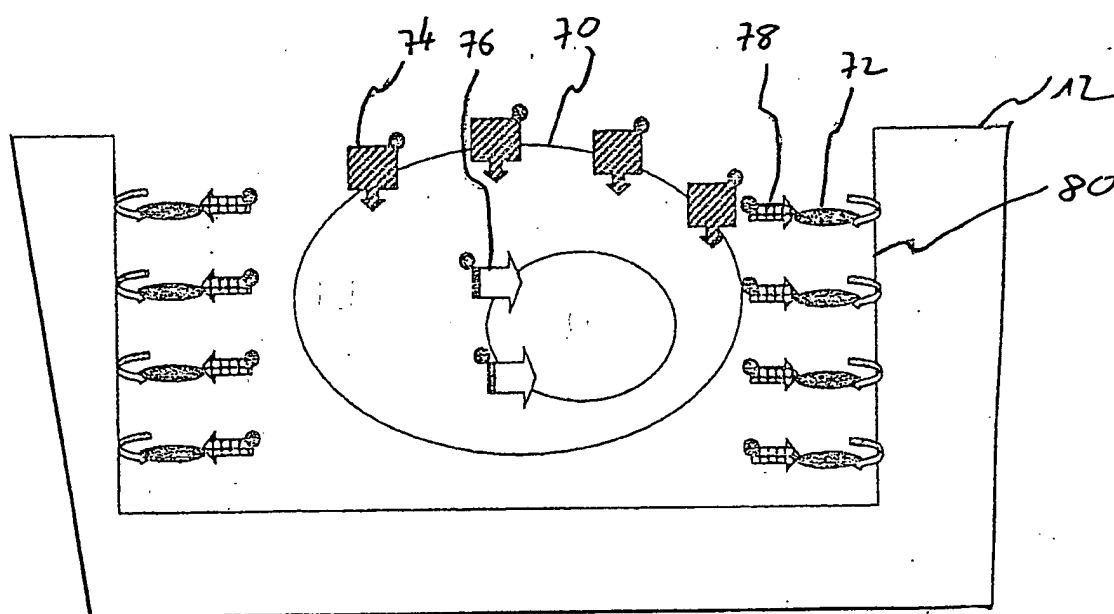


Fig. 1a

**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Juli 2003 (10.07.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/056330 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/543,
33/552, B01J 19/00, B01L 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/14764

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Dezember 2002 (27.12.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 64 578.3 31. Dezember 2001 (31.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE
HOCHTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Winzerlaer Str.
10, 07745 Jena (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: LASSNER, Dirk [DE/DE]; Brockhausstr. 27,
04229 Leipzig (DE). UHLIG, Holm [DE/DE]; Schkeu-
ditzer Str. 1, 04509 Delitzsch (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÖHLER, Johann,
Michael [DE/DE]; Untergasse 8, 07751 Golmsdorf (DE).
MAYER, Günter [DE/DE]; Fritz-Reuter Str. 16, 07745
Jena (DE).

(74) Anwalt: BOCK, Gerhard; Bock & Bieber, Winzerlaer
Str. 10, 07745 Jena (DE).

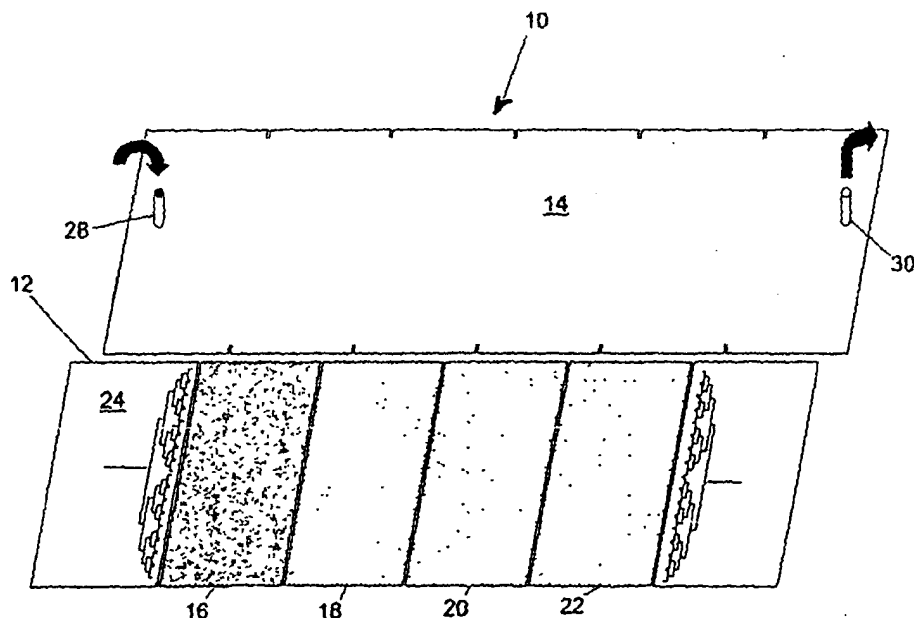
(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, SI, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: CELL SORTING SYSTEM FOR THE SIZE-BASED SORTING OR SEPARATION OF CELLS SUSPENDED IN A
FLOWING FLUID

(54) Bezeichnung: ZELLSORTIERSYSTEM ZUR GRÖSSENABHÄNGIGEN SORTIERUNG ODER SEPARATION VON IN
EINER STRÖMENDEN FLÜSSIGKEIT SUSPENDIERTEN ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a cell sorting system for sorting or separating cells suspended in a flowing fluid according to the size thereof. Said cell sorting system comprises at least one chip (10, 40, 42) provided with a base plate (12) which is overflowed by the fluid and encompasses a plurality of indentations (31, 60, 62, 70, 80).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/056330 A3

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 9. Oktober 2003

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Zellsortiersystem zur größenabhängigen Sortierung oder Separation von in einer strömenden Flüssigkeit suspendierten Zellen. Die Zellsortiersystem zeichnet sich dadurch aus, dass es zumindest einen Chip (10, 40, 42), der eine von der Flüssigkeit überströmte Grundplatte (12) mit einer Vielzahl von Vertiefungen (31, 60, 62, 70, 80) beinhaltet, umfasst.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/14764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 G01N33/552 B01J19/00 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N B01J B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 310 674 A (DEUTSCH MORDECHAI ET AL) 10 May 1994 (1994-05-10) abstract column 3, line 59 -column 4, line 39 column 5, line 36-57 column 7, line 5 -column 8, line 48 column 10, line 12 -column 11, line 46 column 12, line 6-29 column 17, line 32-37 column 18, line 25-65 column 23, line 30 -column 25, line 6 column 28, line 46 -column 29, line 30 claims 1-3,7,12,13; figures 18-36	1,2,6,7, 9-12,15, 17,20
Y	--- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2003

Date of mailing of the international search report

01/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Goetz, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/14764

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 01559 A (EIGEN MANFRED ; HENCO KARSTEN (DE); THUERK MARCEL (DE); DOERING MIC) 12 January 1995 (1995-01-12) page 4, paragraph 2 -page 5, paragraph 1 page 9, paragraph 3 -page 10, paragraph 2 page 16, paragraph 6 -page 17, paragraph 3 page 19, paragraph 1 -page 20, paragraph 1 page 23, paragraphs 1-3 page 25, paragraph 3 page 26, paragraph 3 claims 1,3,46,14,38; figures 14,18	1-3,5,6, 10,11, 17-21
Y	---	1-21
X	DE 197 05 910 C (INST PHYSIKALISCHE HOCHTECH EV) 18 June 1998 (1998-06-18) column 1, line 57 -column 2, line 63 claims 1-4; figures 1-5	1,6,11, 16,19
Y	---	1-21
Y	MAYER G ET AL: "Nanotiterplates for combinatorial chemistry." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS DEC 2001, vol. 82, no. 2, December 2001 (2001-12), pages 137-159, XP002250641 ISSN: 0168-1656 the whole document	1-21
Y	WO 01 94635 A (CHOU HOU PU ;QUAKE STEPHEN R (US); CALIFORNIA INST OF TECHN (US)) 13 December 2001 (2001-12-13) the whole document	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/14764

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5310674	A	10-05-1994	US 5506141 A	09-04-1996
			AT 29070 T	15-09-1987
			AU 562301 B2	04-06-1987
			AU 1401483 A	17-11-1983
			BR 8302395 A	10-01-1984
			CA 1202870 A1	08-04-1986
			CS 8303223 A2	12-05-1989
			DE 3373143 D1	24-09-1987
			DK 190583 A	11-11-1983
			EP 0094193 A2	16-11-1983
			ES 8407592 A1	16-12-1984
			HU 195245 B	28-04-1988
			IL 68507 A	31-01-1986
			IN 159538 A1	23-05-1987
			IN 168081 A1	02-02-1991
			JP 1607661 C	13-06-1991
			JP 2034597 B	03-08-1990
			JP 59031685 A	20-02-1984
			KR 8701670 B1	21-09-1987
			MX 163377 B	06-05-1992
			NO 831637 A ,B,	11-11-1983
			NZ 204056 A	05-12-1986
			SU 1776352 A3	15-11-1992
			US 4729949 A	08-03-1988
			US 5272081 A	21-12-1993
			ZA 8303141 A	25-01-1984
			AT 71664 T	15-02-1992
			AU 594641 B2	15-03-1990
			AU 3672884 A	03-06-1985
			DE 3485462 D1	27-02-1992
			DK 308385 A	05-09-1985
			EP 0162907 A1	04-12-1985
			JP 61501126 T	12-06-1986
			WO 8502201 A1	23-05-1985
WO 9501559	A	12-01-1995	DE 59405534 D1	30-04-1998
			WO 9501559 A2	12-01-1995
			EP 0706646 A1	17-04-1996
DE 19705910	C	18-06-1998	DE 19705910 C1	18-06-1998
			WO 9835755 A1	20-08-1998
			EP 1089821 A1	11-04-2001
			JP 2001513695 T	04-09-2001
WO 0194635	A	13-12-2001	AU 7534001 A	17-12-2001
			EP 1290226 A2	12-03-2003
			WO 0194635 A2	13-12-2001
			US 2002037499 A1	28-03-2002

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 02/14764

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/543 G01N33/552 B01J19/00 B01L3/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N B01J B01L		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 310 674 A (DEUTSCH MORDECHAI ET AL) 10. Mai 1994 (1994-05-10) Zusammenfassung Spalte 3, Zeile 59 - Spalte 4, Zeile 39 Spalte 5, Zeile 36-57 Spalte 7, Zeile 5 - Spalte 8, Zeile 48 Spalte 10, Zeile 12 - Spalte 11, Zeile 46 Spalte 12, Zeile 6-29 Spalte 17, Zeile 32-37 Spalte 18, Zeile 25-65 Spalte 23, Zeile 30 - Spalte 25, Zeile 6 Spalte 28, Zeile 46 - Spalte 29, Zeile 30 Ansprüche 1-3,7,12,13; Abbildungen 18-36	1,2,6,7, 9-12,15, 17,20
Y	--- -/--	1-21
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. August 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 01/09/2003
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Goetz, M

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/14764

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 01559 A (EIGEN MANFRED ; HENCO KARSTEN (DE); THUERK MARCEL (DE); DOERING MIC) 12. Januar 1995 (1995-01-12) Seite 4, Absatz 2 -Seite 5, Absatz 1 Seite 9, Absatz 3 -Seite 10, Absatz 2 Seite 16, Absatz 6 -Seite 17, Absatz 3 Seite 19, Absatz 1 -Seite 20, Absatz 1 Seite 23, Absätze 1-3 Seite 25, Absatz 3 Seite 26, Absatz 3 Ansprüche 1,3,46,14,38; Abbildungen 14,18	1-3,5,6, 10,11, 17-21
Y	---	1-21
X	DE 197 05 910 C (INST PHYSIKALISCHE HOCHTECH EV) 18. Juni 1998 (1998-06-18) Spalte 1, Zeile 57 -Spalte 2, Zeile 63 Ansprüche 1-4; Abbildungen 1-5	1,6,11, 16,19
Y	---	1-21
Y	MAYER G ET AL: "Nanotiterplates for combinatorial chemistry." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS DEC 2001, Bd. 82, Nr. 2, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 137-159, XP002250641 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument	1-21
Y	WO 01 94635 A (CHOU HOU PU ;QUAKE STEPHEN R (US); CALIFORNIA INST OF TECHN (US)) 13. Dezember 2001 (2001-12-13) das ganze Dokument	1-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Akkordzeichen

PCT/EP 02/14764

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5310674 A	10-05-1994	US 5506141 A	09-04-1996
		AT 29070 T	15-09-1987
		AU 562301 B2	04-06-1987
		AU 1401483 A	17-11-1983
		BR 8302395 A	10-01-1984
		CA 1202870 A1	08-04-1986
		CS 8303223 A2	12-05-1989
		DE 3373143 D1	24-09-1987
		DK 190583 A	11-11-1983
		EP 0094193 A2	16-11-1983
		ES 8407592 A1	16-12-1984
		HU 195245 B	28-04-1988
		IL 68507 A	31-01-1986
		IN 159538 A1	23-05-1987
		IN 168081 A1	02-02-1991
		JP 1607661 C	13-06-1991
		JP 2034597 B	03-08-1990
		JP 59031685 A	20-02-1984
		KR 8701670 B1	21-09-1987
		MX 163377 B	06-05-1992
		NO 831637 A ,B,	11-11-1983
		NZ 204056 A	05-12-1986
		SU 1776352 A3	15-11-1992
		US 4729949 A	08-03-1988
		US 5272081 A	21-12-1993
		ZA 8303141 A	25-01-1984
		AT 71664 T	15-02-1992
		AU 594641 B2	15-03-1990
		AU 3672884 A	03-06-1985
		DE 3485462 D1	27-02-1992
		DK 308385 A	05-09-1985
		EP 0162907 A1	04-12-1985
		JP 61501126 T	12-06-1986
		WO 8502201 A1	23-05-1985
WO 9501559 A	12-01-1995	DE 59405534 D1	30-04-1998
		WO 9501559 A2	12-01-1995
		EP 0706646 A1	17-04-1996
DE 19705910 C	18-06-1998	DE 19705910 C1	18-06-1998
		WO 9835755 A1	20-08-1998
		EP 1089821 A1	11-04-2001
		JP 2001513695 T	04-09-2001
WO 0194635 A	13-12-2001	AU 7534001 A	17-12-2001
		EP 1290226 A2	12-03-2003
		WO 0194635 A2	13-12-2001
		US 2002037499 A1	28-03-2002